wycof 26.04.84
4/84 p 7
ob. 84/8070-06

6720

UKD 664.66/68.001.4:543.9-078

WYROBY PRZEMYSŁU SPOŻYWCZEGO	NORMA BRANŻOWA Wyroby piekarskie i ciastkarskie **Mikrobiologiczne metody badań**	**BN-76** **8070-06** Grupa katalogowa XII 39

1. WSTĘP

1.1. Przedmiot normy. Przedmiotem normy są mikrobiologiczne metody badania półproduktów, gotowych wyrobów ciastkarskich i piekarskich oraz sposób określania ich trwałości (próba termostatowa).

1.2. Rodzaje metod badań i zakres stosowania - wg tabl. 1.

Tablica 1

Lp.	Metody badań	Zastosowanie
1	Posiewy mikrobiologiczne	- półprodukty i wyroby ciastkarskie - bułka tarta
2	Próba termostatowa	- pieczywo o przedłużonej trwałości w opakowaniach jednostkowych - wyroby ciastkarskie nietrwałe w opakowaniach jednostkowych - pieczywo pszenne

1.3. Zakres stosowania normy. Metody badań będące przedmiotem normy, mają zastosowanie przy badaniu półproduktów ciastkarskich i piekarskich w toku ich produkcji i obrocie.

2. SPOSÓB POBIERANIA PRÓBEK

2.1. Pobieranie próbek wyrobów gotowych i półproduktów ciastkarskich do posiewów mikrobiologicznych

2.1.1. Sposób pobierania, wielkość i opakowanie próbki. Próbki wyrobów i półproduktów ciastkarskich należy pobierać losowo, metodą na ślepo, posługując się wyjałowionym sprzętem (załącznik 2 p. 1). Sposób pobierania próbki, jej wielkość i opakowanie powinny być zgodne z warunkami przedstawionymi w tabl.2 na str.2. Próbki wyrobów lub półproduktów należy pakować bezpośrednio po pobraniu.

Opakowanie próbki oraz protokół jej pobrania powinny być zgodne z PN-69/A-74250.

2.1.2. Przechowywanie próbek. Próbki półproduktów i wyroby ciastkarskie powinny być przekazane natychmiast po pobraniu do badań mikrobiologicznych. Próbki, które ze względu na transport nie mogą być przekazane do badań w ciągu 1 godz, powinny być umieszczone w temperaturze 0÷4°C i dostarczone do badania w czasie nie dłuższym niż 4 godz.

2.2. Pobieranie próbki bułki tartej do posiewów mikrobiologicznych. Bułka tarta do posiewów mikrobiologicznych powinna być pobierana zgodnie z PN-72/A-74001. Opakowanie próbki powinno spełniać warunek jałowości (załącznik 2 p. 1).

2.3. Pobieranie próbek pieczywa i wyrobów ciastkarskich do wykonania próby termostatowej. Pieczywo oraz wyroby ciastkarskie nietrwałe w opakowaniach jednostkowych do wykonania próby termostatowej powinny być pobierane w liczbie 3 sztuk z każdej partii z zachowaniem pozostałych wymagań zgodnie z PN-70/A-74104 i PN-69/A-74250.

Pobrane próbki powinny być bezpośrednio, a najpóźniej w ciągu 4 godz, przekazane do badania.

Wielkość próbki do badań mikrobiologicznych oraz sposób pobierania i opakowania - wg tabl. 2.

Zgłoszona przez Zakład Badawczy Przemysłu Piekarskiego
Ustanowiona przez Dyrektora Zakładu Badawczego Przemysłu Piekarskiego dnia 20 lutego 1976 r.
jako norma obowiązująca w zakresie czynności określonych normą od dnia 1 stycznia 1977 r.
(Dz. Norm. i Miar nr 9/1976 poz. 30)

WYDAWNICTWA NORMALIZACYJNE 1976. Wpływ do WN 4.3.76. Oddano do składu 13.5.76. Druk ukończono we wrześniu 76. Cena zł 7,20
Obj. 1,70 a. w. Nakład 3000+55 egz. Zam. 1341/76

Tablica 2

Lp.	Produkt badany	Wielkość próbki	Sposób pobierania próbki	Sposób opakowania próbki
1	Wyroby na wagę o masie jednostkowej do 30 g	300 g	z różnych miejsc partii	bezpośrednio w jałowy papier pergaminowy lub folię aluminiową, a następnie czysty pojemnik np. z tworzywa syntetycznego
2	Wyroby o masie jednostkowej 30÷100 g	7 sztuk lecz nie mniej niż 300 g		
3	Wyroby i półprodukty wypiekane o masie jednostkowej powyżej 100 g	300 g		
	- torty	300 g z jednej sztuki	przez wykrojenie od środka części wyrobu o kształcie klina	
	- placki, strucle, mazurki, keksy, serniki	300 g z 3 sztuk	przez wykrojenie kawałków wzdłuż osi poprzecznej z poszczególnych sztuk wyrobu	
	- kapsle, spody, ranty, itp. półprodukty wypieczone	300 g z 3 sztuk	przez wykrojenie kawałków o kształcie zależnym od formy produktu z poszczególnych sztuk	
4	Półprodukty na wagę			Jałowe słoiki, szczelnie zamykane (ze szlifem lub inne)
	- kremy, masy, ciasta surowe, pomady, glazury, kruszonki	300 g	z różnych miejsc partii z uwzględnieniem warstwy zewnętrznej i wewnętrznej	
	- syropy, konfitury, przeciery owocowe	300 g	z różnych miejsc partii po uprzednim wymieszaniu	
	- polewy, galaretki	300 g	przez wykrojenie kawałków z różnych miejsc	

3. METODY BADAŃ

3.1. Posiewy mikrobiologiczne

3.1.1. Przygotowanie próbki do badań

3.1.1.1. Rozdrobnienie próbki. Próbkę półproduktów lub wyrobów należy z zachowaniem warunków jałowości przenieść do wyjałowionego (załącznik 2 p. 2) pojemnika młynka huraganowego (rozdrabniacz GM-2) i rozdrobnić w ciągu 3÷5 s w zależności od rodzaju materiału. W braku rozdrabniacza próbkę ogólną rozetrzeć dokładnie w jałowym moździerzu porcelanowym do uzyskania jednorodnej masy.

3.1.1.2. Homogenizacja próbki. Z rozdrobnionej próbki odważyć 20 g i przenieść z zachowaniem warunków jałowości do jałowego naczynia homogenizatora (załącznik 2 p. 2). Następnie dodać 9-krotną ilość, tj. 180 ml płynu do rozcieńczenia (załącznik 3 p. 1.2) i homogenizować przez 2÷3 min, tak aby uzyskać ogólną liczbę obrotów 15 000 ÷ 20 000.

Otrzymany w ten sposób homogenizat stanowi podstawowe 10-krotne rozcieńczenie produktu, z którego w zależności od potrzeb sporządza się dalsze rozcieńczenia lub bezpośrednio wysiewa na odpowiednie podłoża.

Przed przystąpieniem do sporządzania dalszych rozcieńczeń lub posiewów należy odczekać 10 min, aby nastąpiło oddzielenie warstwy płynnej od stałej. Do dalszych rozcieńczeń lub posiewów pobiera się płyn znad osadu.

3.1.1.3. Przygotowanie rozcieńczeń. Z przygotowanego wg 3.1.1.2 homogenizatu pobrać jałową pipetą 1 ml materiału i przenieść do probówki zawierającej 9 ml roztworu fizjologicznego (załącznik 3 p. 1.3), uważając, aby nie zanurzyć pipety. Po jej samoczynnym opróżnieniu pipetę należy odłożyć. Zawartość probówki dokładnie wymieszać, posługując się nową pipetą, przez 10-krotne wyciąganie płynu (w części dolnej probówki) i wydmuchiwanie (na powierzchni płynu) lub przez wykonywanie 10 ruchów okrężnych dłonią z zamkniętą probówką (tak aby nie zamoczyć korka), a następnie przenieść 1 ml do kolejnej probówki z 9 ml roztworu fizjologicznego i postępować analogicznie jak poprzednio. W ten sposób można dowolnie zwiększyć rozcieńczenie produktu, uzyskując w każdej następnej probówce rozcieńczenie 10-krotnie większe od poprzedniego. Jednocześnie z przygotowywaniem następnego rozcieńczenia należy wykonać posiewy, posługując się tą samą pipetą (najpierw należy przenieść 1 ml badanego rozcieńczenia do kolejnej probówki z roztworem fizjologicznym, a następnie po 1 ml do płytek lub probówek).

3.1.2. Rodzaje oznaczeń i warunki posiewów - wg tabl. 3.

3.1.3. Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych, mezofilnych

3.1.3.1. Wykonanie posiewu. Przed przystąpieniem do właściwych posiewów należy dermatografem zaznaczyć na każdej płytce: numer próby, rozcieńczenie, datę wysiewu i rodzaj podłoża.

Z 3 kolejnych rozcieńczeń 1:100, 1:1 000, 1:10 000, przygotowywanych zgodnie z 3.1.1.3 przenieść pipetą po 1 ml materiału równolegle na 2 płytki Petriego.

Badany materiał zalać (najpóźniej po 20 min) rozpuszczonym i ostudzonym do temperatury 45÷50°C agarem z ekstraktem drożdżowym (załącznik 3 p.2.3) w ilości około 15 ml. Pożywkę wymieszać dokładnie z materiałem badanym, poruszając ostrożnie zamkniętą płytką w kierunkach wzajemnie prostopadłych.

Tablica 3

Lp.	Rodzaj oznaczenia	Wysiewane rozcieńczenia	Rodzaj podłoża	Warunki inkubacji	
				temperatura (°C)	czas (godz)
1	2	3	4	5	6
1	Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych mezofilnych w 1 g produktu	(1:10)[1] 1:100, 1:1 000, 1:10 000, (1:100 000)[2]	agar z ekstraktem drożdżowym	30	72
2	Miano coli	1:10, 1:100, 1:1 000, (1:10 000)[2]	podłoże z żółcią i zielenią brylantową	37	48
3	Liczba przetrwalników Bacillus cereus w 1 g produktu	1:10, 1:100	agar z żółtkiem jaja	30	72
4	Liczba przetrwalników tlenowych bakterii amylolitycznych 1 g produktu	1:10, 1:100, (1:1 000)[2]	agar ze skrobią wg Waksmana	37	48
5	Wykrywanie obecności gronkowców koagulazo-dodatnich w 0,1 g produktu	1:10	zgodnie z PN-75/A-04024		
6	Wykrywanie obecności pałeczek Salmonella i Shigella w 5 g produktu	rozdrobniona próbka (5 g)	- podłoże SF - podłoże z czterotionianem sodu	37 37	24 24
7	Miano beztlenowych laseczek (dla produktów w hermetycznych opakowaniach	1:10, 1:100	podłoże Wrzoska	37	24÷48
8	Liczba pleśni i drożdży w 1 g produktu	1:10, 1:100, 1:1 000	agar na brzeczce	30	48÷72

[1] Wysiewać w przypadku produktów o niskim stopniu zakażenia.
[2] Wysiewać w przypadku produktów podejrzanych o wysoki stopień zakażenia.

Po zestaleniu agaru, płytki odwrócone dnem do góry, wstawić do cieplarki o temperaturze 30°C na 72 godz.

3.1.3.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Po okresie inkubacji płytki należy obejrzeć, a do liczenia przeznaczyć te, na których liczba kolonii waha się w granicach 30 ÷ 300. Przy liczeniu kolonii należy zaznaczyć je dermatografem, aby uniknąć pomyłek. Przy obliczeniach za podstawę przyjąć średnią arytmetyczną z liczby kolonii na 2 równoległych płytkach, pomnożyć przez rozcieńczenie, ilość wysiewanego materiału na płytkę i wynik końcowy odnieść do 1 g produktu.

Jeżeli liczba kolonii na wszystkich płytkach jest mniejsza niż 30, wówczas należy podać wynik uzyskany z najniższego rozcieńczenia. Jeżeli liczba kolonii na wszystkich płytkach jest wyższa niż 300, wówczas należy podać wynik otrzymany z najwyższego rozcieńczenia przez policzenie kolonii wyrosłych na wycinku koła, np. na 1/4 i odniesienie do całości.

3.1.4. Oznaczanie miana coli

3.1.4.1. Wykonanie posiewu. Z 3 kolejnych rozcieńczeń 1:10, 1:100, 1:1 000 przygotowanych zgodnie z 3.1.1.2 i 3.1.1.3 przenieść po 1 ml badanego materiału do probówek z podłożem z żółcią i zieleniną brylantową (załącznik 3 p. 2.4).

Probówki z posiewami umieścić w cieplarce o temperaturze 37°C na 48 godz.

3.1.4.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Wzrost na pożywce oraz występowanie gazu w rurce Durhama wskazuje na obecność bakterii z grupy coli.

Dla potwierdzenia wyniku z 2 ostatnich probówek, w których stwierdzono gaz, pobrać ezą nieco materiału i przenieść na powierzchnię dobrze obsuszonego podłoża Endo (załącznik 3 p. 2.5).

Wykonać posiew redukcyjny, aby otrzymać pojedyncze kolonie.

Inkubację prowadzić w temperaturze 37°C przez 48 godz.

Pałeczki z grupy coli rosną na podłożu Endo w postaci kolonii różowych lub czerwonych z metalicznym połyskiem.

Z charakterystycznych kolonii należy sporządzić preparat mikroskopowy barwiony metodą Grama (załącznik 4). Pałeczki z grupy coli należą do drobnoustrojów Gram-ujemnych. Jako miano coli podać ostatnie rozcieńczenie, w którym przy posiewie na pożywkę z żółcią i zielenią brylantową stwierdzono obecność pałeczek z grupy coli, potwierdzoną przez wzrost na podłożu Endo i barwienie metodą Grama. Przy braku wzrostu w najniższym stężeniu należy podać miano, które nie może być większe niż 0,1. W przypadku dalszych badań w celu określenia miana Escherichia coli, należy ze wszystkich posiewów dodatnich, na podłożu z żółcią i zielenią brylantową, przesiać hodowlę do probówek z nowym podłożem z żółcią i zielenią brylantową

oraz do probówek z wodą peptonową (załącznik 3 p. 2.6). Posiewy inkubować w łaźni wodnej o temperaturze 44 ±0,5°C w ciągu 48 godz. Po okresie inkubacji do probówek z wodą peptonową dodać ostrożnie, nawarstwiając po ściance, parę kropli odczynnika Kovaca (załącznik 3 p. 1.8). Powstanie różowego pierścienia świadczy o obecności indolu (wynik dodatni). Wytwarzanie gazu na podłożu z żółcią i zielenią brylantową w temperaturze 44°C oraz dodatnia próba na indol świadczą o obecności Escherichia coli. Jako miano Escherichia coli podać ostatnie rozcieńczenie, w którym stwierdzono obecność tych pałeczek przy posiewie na podłożu z żółcią i zielenią brylantową potwierdzoną próbą na indol.

3.1.5. Oznaczanie liczby przetrwalników Bacillus cereus

3.1.5.1. Wykonanie posiewu. Z rozcieńczenia 1:10, przygotowanego zgodnie z 3.1.1.2 przelać jałowo około 100 ml homogenizatu do słoika pojemności 200 ml z doszlifowanym korkiem, dodać perełki szklane (5 ÷ 10 sztuk) i dokładnie wymieszać. Słoik umieścić w łaźni wodnej w temperaturze 80°C i stale mieszając zawartość ogrzewać przez 20 min. Po ogrzaniu mieszaninę ostudzić, wykonać dodatkowe rozcieńczenie (1:100) zgodnie z 3.1.1.3 i po 0,1 ml z rozcieńczeń 1:10 i 1:100 przenieść na powierzchnię dobrze obsuszonego podłoża z agarem i żółtkiem jaja (załącznik 3 p.2.7) oraz dodatkowo z rozcieńczenia 1:10 posiać po 0,5 ml na dwie płytki, aby obliczyć liczbę kolonii w przypadku małego zakażenia produktu przez Baciuus cereus. Natychmiast rozprowadzić materiał na całej powierzchni płytki za pomocą wysterylizowanej w alkoholu i opalonej głaszczki.

Inkubację prowadzić w temperaturze 30°C przez 48 ÷ 72 godz.

3.1.5.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Podejrzane o przynależność do Bacillus cereus są te kolonie, wokół których występuje matowa strefa strąconych kwasów tłuszczowych. W razie obecności takich kolonii wykonać preparat mikroskopowy barwiony metodą Grama (załącznik 4). Bacillus cereus jest laseczką Gram-dodatnią.

Dla potwierdzenia wyników należy przesiać wszystkie podejrzane kolonie przez dotknięcie ich drucikiem i przeniesienie materiału sposobem punktowym na płytę z agarem z krwią (załącznik 3 p. 2.8). Posiewy inkubować w temperaturze 30°C przez 72 godz. Kolonie Bacillus cereus na podłożu z krwią są otoczone strefą całkowitej hemolizy (odbarwienie podłoża).

3.1.6. Oznaczanie liczby przetrwalników bakterii tlenowych amylolitycznych

3.1.6.1. Wykonanie posiewu. Z rozcieńczenia 1:10 pasteryzowanego i ostudzonego zgodnie z 3.1.5.1 wykonać dodatkowe rozcieńczenie (1:100) zgodnie z 3.1.1.3 i po 1 ml z rozcieńczeniem 1:10, 1:100 przenieść równolegle na 2 płytki Petriego i zalać agarem ze skrobią wg Waksmana (załącznik 3 p.2.9). Posiewy inkubować w temperaturze 37°C przez 48 godz.

3.1.6.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Po okresie inkubacji płytki zalać roztworem Lugola (załącznik 3 p. 1.3). Kolonie bakterii amylolitycznych otoczone są jasną strefą w wyniku rozkładu skrobi.

3.1.7. Wykrywanie obecności gronkowców koagulazo-dodatnich w 0,1 g produktu - wg PN-75/A-04024

3.1.8. Wykrywanie obecności pałeczek Salmonella i Shigella w 5 g produktu

3.1.8.1. Wykonanie posiewu. Z próbki rozdrobnionej zgodnie z 3.1.1.1 odważyć, posługując się jałowym skalpelem, po 5 g produktu i przenieść:

a) do kolby z podłożem SF (załącznik 3 p. 2.10)

b) do kolby z podłożem z czterotionianem sodu (załącznik 3 p. 2.11). Zawartość kolb wymieszać, inkubować w temperaturze 37°C przez 24 godz.

3.1.8.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Z płynnych podłoży namnażających wykonać ezą posiew redukcyjny (tak aby uzyskać pojedyncze kolonie) na podłoża SS (załącznik 3 p. 2.13) oraz Mac Conkeya (załącznik 3 p. 2.12) lub Sołtysa (załącznik 3 p. 2.14). Posiewy z obu podłoży płynnych wykonywać na 1 płytce podłoża stałego, przeznaczając na hodowlę pochodzącą z jednej kolby połowę powierzchni płytki. Posiewy inkubować w temperaturze 37°C przez 24 godz.

Na podłożu SS pałeczki Samonella i Shigella tworzą drobne wypukłe kolonie o brzegach równych. Kolonie pałeczek Shigella są przejrzyste, koloru podłoża lub lekko różowe. Pałeczki Salmonella rosną podobnie, lecz ich kolonie są bardziej żółtę i gdy wytwarzają duże ilości siarkowodoru, środek kolonii jest zaczerniony.

Na podłożu Mac Conkeya pałeczki Salmonella i Shigella tworzą bezbarwne, przejrzyste kolonie.

Na podłożu Sołtysa pałeczki Salmonella rosną w postaci suchych płaskich kolonii o brzegach postrzępionych, koloru nieco jaśniejszego niż podłoże lub tworzą kolonie kremowożółte, odbarwiając podłoże dookoła kolonii od jasnozielonego koloru do kremowego. Podłoże to hamuje wzrost pałeczek Shigella.

Podejrzane kolonie należy dalej identyfikować zgodnie z PN-64/A-04023.

3.1.9. Oznaczanie miana beztlenowych laseczek (przetrwalnikujących i nieprzetrwalnikujących)

3.1.9.1. Wykonanie posiewu. Z rozcieńczeń 1:10 i 1:100 przygotowanych zgodnie z 3.1.1.2 i z 3.1.1.3 przenieść po 1 ml badanego materiału do probówek ze zregenerowanym (przez 10 min ogrzewanie w temperaturze 80°C) podłożem Wrzoska (załącznik 3 p. 2.15), wprowadzając płyn pod warstwę parafiny. Z każdego rozcieńczenia posiewać po 2

probówki, jedną z nich po posiewie ogrzewać przez 10 min w temperaturze 80°C w celu zabicia form wegetatywnych.

Posiewy inkubować w temperaturze 37°C przez 48 ÷ 72 godz.

3.1.9.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. W przypadku wykrycia gazu pod parafiną wykonać preparat barwiony metodą Grama (załącznik 4). W przypadku stwierdzenia laseczek Gram-dodatnich wykonać dalsze badania. Pipetą pasterowską pobrać z dna probówki nieco materiału i przenieść na płytkę Petriego, którą zalewa się ostudzonym do temperatury 45°C podłożem Wilson-Blaira (załącznik 3 p. 2.18).

Po zastygnięciu podłoża Wilson-Blaira płytkę zalać grubą (około 2 cm) warstwą agaru wodnego (załącznik 3 p. 2.17) lub hodować w anaerostacie w celu stworzenia warunków beztlenowych. Posiewy inkubować w temperaturze 37°C przez 48 godz. Zaczernienie całego podłoża lub wokół kolonii świadczy o obecności beztlenowców. Jako miano laseczek beztlenowych nieprzetrwalnikujących podać ostatnie rozcieńczenie, w którym stwierdzono gaz na podłożu Wrzoska w szeregu probówek nie ogrzanych po posiewie, przy braku wzrostu w szeregu probówek po ogrzaniu. Jako miano laseczek beztlenowych przetrwalnikujących podać ostatnie rozcieńczenie, w którym stwierdzono gaz na podłożu Wrzoska w szeregu probówek ogrzanych po posiewie.

3.1.10. Oznaczanie liczby pleśni i drożdży

3.1.10.1. Wykonanie posiewu. Z 3 kolejnych rozcieńczeń: 1:10, 1:100, 1:1 000, przygotowanych zgodnie z 3.1.1.2 i z 3.1.1.3 przenieść po 1 ml badanego materiału równolegle na 3 płytki Petriego i zalać rozpuszczonym agarem na brzeczce (załącznik 3 p. 2.19).

Posiewy inkubować w temperaturze 30°C przez 72 godz, a w przypadku braku wzrostu do 5 dni.

3.1.10.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Obserwacje wzrostu kolonii prowadzić co 24 godz w celu uchwycenia właściwego momentu ich rozwoju, umożliwiającego dokładne policzenie.

Za wynik właściwy należy przyjąć średnią z 2 zbliżonych wyników. Jednej płytki, na której wyrosły pleśnie, nie bierze się pod uwagę. Oddzielnie liczyć kolonie drożdży i pleśni, w wątpliwych przypadkach posłużyć się lupą.

3.2. Próba termostatowa

3.2.1. Próba termostatowa na wykrywanie zakażeń pleśniowych

3.2.1.1. Wykonanie oznaczania. Próbkę pobraną zgodnie z 2.3 umieścić w cieplarce w temperaturze 30°C. Czas trwania próby termostatowej powinien odpowiadać:

a) w kontroli trwałości - okresowi trwałości ustalonemu dla danego wyrobu,

b) przy ustalaniu trwałości dla nowych wyrobów - okresowi wystąpienia objawów pleśnienia lub przewidywanemu okresowi trwałości.

3.2.1.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Brak objawów pleśnienia w okresie odpowiadającym trwałości badanego wyrobu należy uznać za wynik ujemny (-). Wystąpienie widocznych gołym okiem ognisk pleśni o różnej barwie przed upływem zakładanego okresu próby termostatowej należy uznać za wynik dodatni (+). Przy ustalaniu trwałości dla nowych wyrobów za okres trwałości należy uznać liczbę dni, od zapoczątkowania próby termostatowej, w ciągu których nie stwierdzono objawów pleśnienia. Jeżeli spośród 3 termostatowanych opakowań stanowiących próbkę laboratoryjną jedno wykaże objawy pleśnienia (wynik dodatni), ogólny wynik próby termostatowej należy uznać za dodatni.

3.2.2. Próba termostatowa na wykrywanie zakażeń tlenowymi bakteriami przetrwalnikującymi amylolitycznymi, powodującymi chorobę ziemniaczaną pieczywa

3.2.2.1. Wykonanie oznaczenia. Z próby laboratoryjnej pobranej zgodnie z 2.3 wykroić czystym, opalonym nożem ze środka każdej sztuki 1 kromkę o grubości 3 cm (łącznie 3 kromki) i umieścić w jałowym słoju, po czym wstawić do cieplarki o temperaturze 37°C.

Czas trwania próby termostatowej do 72 godz. Po 24 godz wyjąć słoik z cieplarki, otworzyć z zachowaniem warunków jałowości, ocenić zapach próby oraz stan miękiszu przez rozłamanie jednej z kromek. Jeżeli nie obserwuje się zmian, próbę należy termostatować dalej. Ponowne oględziny należy przeprowadzić po 48 godz, a w razie braku zmian po 72 godz.

3.2.2.2. Odczytanie i interpretacja wyniku. Wystąpienie w jednej z kromek ciągliwości lub mazistości miękiszu, lub rozluźnienie jego konsystencji połączone z wystąpieniem charakterystycznego estrowego zapachu, lub bez zapachu należy traktować jako wynik dodatni próby (+).

Wystąpienie powyższych objawów zepsucia pieczywa w czasie próby termostatowej świadczy o znacznym zakażeniu mąki tlenowymi amylolitycznymi bakteriami przetrwalnikującymi i konieczności zastosowania odpowiednich środków technologicznych. Im szybsze są objawy zepsucia tym wyższy stopień zakażenia mąki.

K O N I E C

Załączniki

Informacje dodatkowe

ZAŁĄCZNIK 1

APARATURA SPRZĘT I MATERIAŁY POMOCNICZE

1. Pobieranie próbek

Noże, łopatki, łyżki, szczypce.

Słoiki zamykane na szlif lub inne szczelnie zamykane pojemności 500÷1000 ml.

Pojemniki plastikowe z pokrywą o wymiarach około 30×20×15 cm.

Papier pergaminowy lub folia aluminiowa.

2. Przygotowanie próbki do badań

Młynek huraganowy (rozdrabniacz GM-2).

Homogenizator Unipan typ 302 lub inny równorzędny np. "Stomacher".

Moździerz porcelanowy o średnicy 20 cm z tłuczkiem.

3. Wykonywanie posiewów mikrobiologicznych i badań mikroskopowych

Cieplarka z termoregulacją o temperaturze 30 ±1°C.

Cieplarka z termoregulacją o temperaturze 37 ±1°C.

Anaerostat.

Łaźnia wodna o temperaturze 80°C.

Lupa o 8-krotnym powiększeniu.

Mikroskop biologiczny z obiektywem imersyjnym.

Probówki bakteriologiczne o wymiarach 1,6×18 cm.

Pipety 10 ml.

Pipety serologiczne 1 ml.

Płytki Petriego o średnicy 10 cm.

Słoiki z doszlifowanym korkiem 200 ml.

Rurki Durhama.

Szkiełka przedmiotowe.

Szkiełka przykrywkowe.

Perełki szklane.

Skalpel.

Pipety pasterowskie wykonane z rurek szklanych ze szkła neutralnego, długości 15 cm i średnicy 0,6 cm, zamkniętych z obu stron koreczkami z waty. Z każdej rurki uzyskuje się 2 pipety pasterowskie przez silne ogrzanie rurki palnikiem w środku jej długości i wyciągnięcia w kapilarę.

Głaszczki szklane wykonane z pręcików szklanych o średnicy 0,35 cm i długości 20 cm poprzez zgięcie pod kątem prostym 3 cm odcinka końcowego. Końce pręcików szklanych powinny być zaokrąglone. Eza (oczko platynowe) wykonana z drucika platynowego (lub częściej tantalowego) umieszczonego w obsadzie. Wolny koniec zawija się w kształcie kółka o średnicy 2÷5 mm.

4. Przygotowywanie podłoży

Wirówka 3000 obr/min.

Pehametr.

Lodówka.

Waga techniczna.

Waga analityczna.

5. Sterylizacja podłóż i szkła

Autoklaw.

Aparat Kocha.

Suszarka z termoregulacją o temperaturze 160 ÷ 180°C.

Filtr bakteriologiczny: aparat z sączkami EK lub aparat do sączków membranowych i sączkami Coli 5 lub świeca Berkefelda lub świeca Chamberlanda.

ZAŁĄCZNIK 2

PRZYGOTOWANIE APARATURY, SPRZĘTU I SZKŁA LABORATORYJNEGO DO BADAŃ MIKROBIOLOGICZNYCH

1. PRZYGOTOWANIE SPRZĘTU I MATERIAŁÓW DO POBIERANIA I OPAKOWANIA PRÓBEK

Drobny sprzęt do pobierania próbek (łyżki, noże, szczypce itp.) należy wyjałowić, po uprzednim szczelnym zapakowaniu w papier, w suszarce (w ciągu 2 godz w temperaturze 160°C) lub autoklawie (w ciągu 0,5 godz. w temperaturze 121°C). Można również jałowić przez zanurzenie w skażonym alkoholu i ostrożne opalanie bezpośrednio przed użyciem.

Słoiki jałowić zgodnie z warunkami mycia i wyjałowienia szkła laboratoryjnego wg 3.3. Papier lub folię należy jałowić po złożeniu w niewielkie pakiety w suszarce w ciągu 2 godz w temperaturze 130°C. Pojemniki plastykowe jako opakowania pośrednie powinny być dokładnie wymyte i osuszone.

2. PRZYGOTOWANIE ROZDRABNIACZA I HOMOGENIZATORA DO BADAŃ

Przed użyciem ww. aparatów ich części stykające się bezpośrednio z badaną próbą należy dokładnie wymyć i osuszyć. Części aparatów nie osadzone na stałe, jak pojemniki, nożyki tnące, należy wyjałowić w suszarce (w ciągu 2 godz w temperaturze 160°C) lub autoklawie (w ciągu 0,5 godz w temperaturze 121°C).

Przedmioty te należy sterylizować dokładnie opakowane w papier. Części urządzeń osadzone na stałe, a stykające się również z badaną próbą, po wymyciu i osuszeniu, bezpośrednio przed użyciem należy przemyć skażonym alkoholem i ostrożnie opalić.

3. PRZYGOTOWANIE SZKŁA LABORATORYJNEGO DO BADAŃ

3.1. Mycie szkła nowego. Nowe szkło nieużywane w celu usunięcia niepożądanych substancji alkalicznych należy umieścić na kilka godzin w 1-procentowym roztworze kwasu solnego lub wygotować w nim w ciągu 15 ÷ 20 min. Następnie należy szkło wypłukać w wodzie wodociągowej, a później kilkakrotnie w destylowanej.

3.2. Mycie szkła używanego. Po usunięciu zawartości szkło należy wymyć za pomocą szczotki w ciepłej wodzie z dodatkiem detergentu syntetycznego (Ludwik, Kokosal, FF itp.), następnie dokładnie wypłukać w ciepłej wodzie bieżącej i kilkakrotnie w wodzie destylowanej.

Pipiety silnie zanieczyszczone substancjami organicznymi lub inne rodzaje szkła z zanieczyszczeniami, nie dającymi się usunąć w powyższy sposób, należy po usunięciu zawartości i wymyciu zanurzyć co najmniej na 24 godz w mieszaninie chromowej, po czym należy dokładnie wypłukać w wodzie bieżącej, a następnie kilkakrotnie w wodzie destylowanej.

Szczególnie ostrożnie należy obchodzić się ze szkłem (np. płytkami, probówkami), które bezpośrednio kontaktowało się z drobnoustrojami chorobotwórczymi. Szkło zawierające drobnoustroje chorobotwórcze umieszcza się w pojemniku z pokrywą specjalnie do tego celu przeznaczonym i wyjaławia w autoklawie w temperaturze 132°C przez 30 min.

3.3. Wyjaławianie szkła. Szkło przeznaczone do wyjaławiania powinno być dokładnie wymyte i wysuszone.

Szkło do wyjaławiania należy przygotować w sposób następujący: płytki Petriego zawija się w papier (pojedynczo lub po kilka) albo umieszcza w metalowych tubusach. Probówki korkuje się korkami z waty i zawija dokładnie papierem w paczki zawierające po 10 ÷ 20 sztuk. Kolby płaskodenne i kolby stożkowe korkuje się podobnie jak probówki i nakłada na korek kapturek z papieru. Pipety po umieszczeniu w ich górnym otworze wacika pakuje się w papier pojedynczo lub po kilka, obwiązując sznurkiem, lub umieszcza w specjalnych tubusach. Rurki szklane na pipety pasterowskie pocięte na odcinki o długości około 15 cm i zatkane z obydwu końców watą pakuje się w papier po 20 ÷ 30 sztuk. Naczynia z korkiem doszlifowanym wyjaławia się następująco: otwór zawija się papierem i obwiązuje sznurkiem, oddzielnie zawija się w papier korek i przywiązuje do szyjki naczynia. Szkło wyjaławia się suchym powietrzem w suszarce w ciągu 2 godz w temperaturze 160°C, licząc od czasu osiągnięcia tej temperatury. Po ukończeniu sterylizacji szkło wyjąć po spadku do temperatury poniżej 50°C. Szkło można wyjaławiać w temperaturze 170 ÷ 175°C przez 1 godz. Stosowanie wyższych temperatur może spowodować zwęglenie korków i opakowań papierowych.

3.4. Przechowywanie jałowego szkła. Szkło wyjałowione przechowywać w czystych i szczelnie zamkniętych szafach laboratoryjnych.

4. PRZYGOTOWANIE FILTRÓW BAKTERIOLOGICZNYCH DO STERYLIZACJI ROZTWORÓW

Sączki Seitza należy zakładać do aparatu, nie dokręcając całkowicie nasadki, i wyjaławiać wraz z aparatem w autoklawie po owinięciu górnej części aparatu w papier. Przed użyciem filtru nasadkę należy dokręcić. Sączki Coli 5 wyjałowić przez gotowanie w ciągu 30 min w wodzie destylowanej i nakładać z zachowaniem warunków jałowości do aparatu uprzednio wyjałowionego. Świece Chamberlanda po wymyciu i wysuszeniu wyżarzyć w piecu muflowym w temperaturze 500°C, przemyć wodą destylowaną i wyjaławiać wraz z korkiem gumowym dopasowanym do kolby ssawkowej po owinięciu całości w papier. Kolbę ssawkową owiniętą w papier wyjaławiać oddzielnie w suszarce.

Szkiełka przedmiotowe i przykrywkowe używane należy gotować w wodzie z dodatkiem detergentów przez 30 min i następnie w wodzie bieżącej, osuszyć i przechowywać w naczyniu z mieszaniną alkoholu etylowego i eteru etylowego w stosunku 1:1.

Szkło zawierające hodowle drobnoustrojów należy przed przystąpieniem do mycia odkażać przez:

a) gotowanie przez 30 min w aparacie Kocha,

b) umieszczenie w płynie odkażającym (2-procentowym lizolu lub 5-procentowym sterinolu) na 12 godz.

ZAŁĄCZNIK 3

ROZTWORY I PODŁOŻA

1. ROZTWORY PODSTAWOWE I BARWNIKI

1.1. Postanowienia ogólne. Do regulowania pH roztworów używać 10-procentowego wodorotlenku sodowego i 10-procentowego kwasu solnego.

1.2. Płyn do rozcieńczania (detoksyfikacji)

Woda destylowana 1000 ml.

Pepton Peptobak (Bacutil) 1 g.

Chlorek sodowy 8,5 g.

Pepton i chlorek sodowy rozpuścić w wodzie przez gotowanie, doprowadzić pH 7,2 ÷ 7,4 i rozlać miarowo do butelek (najczęściej po 180 ml). Sterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 20 min. Końcowe pH powinno wynosić 7,0.

1.3. Fizjologiczny roztwór chlorku sodowego

Woda destylowana 1000 ml.

Chlorek sodowy 8,5 g.

Wszystkie składniki rozpuścić w wodzie i rozlać do butelek.

Sterylizować w temperaturze 121°C w ciągu 20 min, pH końcowe powinno wynosić 7,0 (±0,1)

1.4. Płyn Lugola 1:1 (do wykrywania drobnoustrojów rozkładających skrobię)

Woda destylowana 600 ml.

Jod 1 g.

Jodek potasowy 2 g.

Jodek potasowy rozpuścić w kilku ml wody, dodać jod i po jego całkowitym rozpuszczeniu uzupełnić pozostałą wodą.

1.5. Fiolet krystaliczny

Roztwór A

Fiolet krystaliczny 0,4 g.

Alkohol etylowy 96-procentowy 10 ml.

Roztwór B

Fenol, roztwór wodny 1-procentowy 100 ml.

Zmieszać roztwory A i B.

1.6. Fuksyna fenolowa

Roztwór A

Fuksyna zasadowa 0,3 g.

Alkohol etylowy 96-procentowy 10 ml.

Roztwór B

Fenol, roztwór wodny 5-procentowy 100 ml.

Zmieszać roztwory A i B. Do barwienia używać roztwór fuksyny rozcieńczony wodą destylowaną 10 ÷ 20-krotnie.

1.7. Płyn Lugola (do barwienia preparatów metodą Grama).

Woda destylowana 300 ml.

Jod 1 g.

Jodek potasowy 2 g.

Jodek potasowy rozpuścić w kilku mililitrach wody, dodać jod i po jego całkowitym rozpuszczeniu uzupełnić pozostałą wodą.

1.8. Odczynnik Kovaca (do wykrywania indolu)

p-Dwumetyloaminobenzaldehyd 5 g.

Alkohol amylowy 96-procenotwy 75 ml.

Kwas solny stężony 25 ml.

Aldehyd rozpuścić w alkoholu ogrzewając w temperaturze 55°. Oziębić i dodać kwas. Przechowywać w ciemnej butelce w temperaturze około 4°C.

2. PODŁOŻA BAKTERIOLOGICZNE

2.1. Postanowienia ogólne. Do regulowania pH podłóż używać 10-procentowego wodorotlenku sodowego lub 10-procentowego kwasu solnego.

2.2. Bulion zwykły przygotować z Suchego bulionu mięsnego produkowanego przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek w Warszawie BIOMED zgodnie ze sposobem zamieszczonym na opakowaniu.

W przypadku braku podłoża w stanie suchym należy przygotować je wg następującego przepisu:

wyciąg mięsny 1000 ml,

pepton Peptobak (Bacutil) 10 g,

chlorek sodowy 5 g.

Przygotowanie wyciągu mięsnego: mięso wołowe w ilości 1000 g bez kości, oczyszczone z tłuszczu i ścięgien, zemleć w maszynce i zalać 2000 ml wody wodociągowej.

Odstawić na noc do chłodni (około +4°C). Następnego dnia gotować przez 30 min, przesączyć przez płótno, dopełnić wodą destylowaną do 2 l i rozlać do kolb. Sterylizować w temperaturze 128°C przez 20 min.

Przed użyciem przesączyć zimny wyciąg przez bibułę.

Przygotowanie podłoża: rozpuścić w wyciągu mięsnym pepton i chlorek sodowy. Doprowadzić pH 7,8 ÷ 7,9, gotować kilkanaście minut, przesączyć przez bibułę i rozlać do kolb. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min, Końcowe pH powinno wynosić 7,4 ÷ 7,6.

2.3. Agar z ekstraktem drożdżowym

Woda destylowana 1000 ml.

Ekstrakt drożdżowy 2,5 g.

Pepton Peptobak (Bacutil) 5 g.

Agar 15 g.

Składniki rozpuścić w wodzie na gorąco, doprowadzić pH 7,4 ÷ 7,5 i rozlać do kolb. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min. Końcowe pH powinno wynosić 7,0 ÷ 7,2.

2.4. Podłoże z żółcią i zielenią brylantową

Woda destylowana 800 ml.

Żółć wołowa 200 ml.

Pepton Amonobak (Bacutil) 10 g.

Laktoza 10 g.

Zieleń brylantowa, roztwór wodny 0,1-procentowy 13,3 ml.

Do wody destylowanej dodać żółć i pepton. Rozpuścić składniki i doprowadzić pH do 7,4, zagotować, przesączyć przez bibułę, dodać laktozę i zieleń brylantową. Rozlać po 10 ml do probówek rurkami Durhama. Sterylizować w temperaturze 117°C w ciągu 30 min. Końcowe pH powinno wynosić 7,1÷7,4.

2.5. Podłoże Endo (modyfikacja PZH)

Woda destylowana 2000 ml.

Bulion zwykły 1000 ml.

Pepton 20 g.

Chlorek sodowy 10 g.

Agar 60 g.

Laktoza 30 g.

Fuksyna zasadowa, roztwór alkoholowy 3-procentowy 30 ml.

Siarczyn sodowy bezwodny, roztwór wodny 10-procentowy około 160 ml.

Do bulionu i wody dodać pepton, chlorek sodowy agar i laktozę, rozpuścić w parze bieżącej. Doprowadzić pH do 7,8 i rozlać po 150 ml do kolb. Sterylizować w temperaturze 117°C przez 30 min. Przed rozlaniem na płytki do rozpuszczonego podłoża dodać na każde 150 ml podłoża około 1 ÷ 1,5 ml fuksyny i 8 ml siarczynu sodowego (każdorazowo świeżo przygotowanego) do uzyskania barwy bladoróżowej, po czym rozlać na płytki Petriego.

Płytki z kompletnym podłożem można przechowywać w ciemnym chłodnym (4°C) miejscu nie dłużej niż 2 tygodnie.

2.6. Woda peptonowa (do próby na indol)

Woda destylowana 1000 ml.

Pepton Peptobak (Bacutil) 10 g.

Rozpuścić w wodzie pepton przez gotowanie. Doprowadzić pH do 7,2, zagotować, przesączyć przez bibułę, rozlać do małych probówek i sterylizować w temperaturze 121° przez 20 min. Po przygotowaniu sprawdza się za pomocą odczynnika Kovaca czy samo podłoże nie daje reakcji na indol.

2.7. Agar z żółtkiem jaja

Bulion zwykły (2.2) 1000 ml.

Agar 15 g.

Emulsja żółtka jaja, roztwór 10-procentowy w soli fizjologicznej (1.3) 100 ml.

a) Przygotowanie emulsji żółtka jaja: świeże jajo umyć wodą z mydłem, wytrzeć watą zwilżoną w alkoholu i opalić, 10 ml żółtka przenieść do jałowego słoika, z doszlifowanym korkiem, zawierającego 90 ml roztworu fizjologicznego i szklane perełki, zawartość dokładnie wymieszać.

b) Przygotowanie podłoża: w bulionie rozpuścić agar, doprowadzić pH 7,8 ÷ 7,9, sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min, rozpuszczony i ostudzony do temperatury 50°C agar zamieszać z emulsją żółtka jaja i rozlać na płytki.

2.8. Agar z krwią

Bulion zwykły (2.1) 1000 ml.

Agar 20 g.

Krew barania jałowa, odwłókniona 100 ml.

W bulionie rozpuścić agar, doprowadzić pH 7,8÷7,9. Sterylizować w temperaturze 121°C przez 20 min. Rozpuszczony i ostudzony do temperatury 50°C agar zmieszać z krwią baranią i rozlać na płytki.

2.9. Agar ze skrobią wg Waksmana.

Woda destylowana 500 ml.

Fosforan dwupotasowy (K_2HPO_4) 1 g.

Chlorek sodowy 1 g.

Siarczan amonu ($NH_4/_2SO_4$) 2 g.

Węglan wapniowy 5 g.

Agar 20 g.

Skrobia ziemniaczana, roztwór wodny 2-procentowy 500 ml.

10 g skrobi ziemniaczanej zawiesić w 800 ml wody destylowanej i ogrzewać na łaźni wodnej przy ciągłym mieszaniu. Odparować wodę do objętości 500 ml. W wodzie destylowanej rozpuścić sole, z wyjątkiem węglanu wapniowego, doprowadzić do 6,2 pH, po czym dodać węglan wapniowy zawieszony w 10 ml wody i roztwór skrobi. Podłoże dobrze wymieszać i rozlać do mniejszych naczyń. Sterylizować w temperaturze 117°C przez 30 min.

2.10. Podłoże SF (z kwaśnym seleninem sodowym)

Woda destylowana 1000 ml.

Kwaśny selenin sodowy 4 g.

Pepton Aminobak (Bacutil) 5 g.

Fosforan jednosodowy (NaH_2PO_4) 3 g.

Fosforan dwusodowy ($Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$) 16 g.

Laktoza 4 g.

Składniki rozpuścić na gorąco, doprowadzić pH 7,0÷7,1, zagotować, przesączyć przez bibułę i rozlać do jałowych kolb po około 50 ml. Gotować w parze bieżącej przez 20 min. Nie wyjaławiać pod ciśnieniem i nie gotować dłużej, gdyż powstaje czerwony osad, który wpływa ujemnie na jakość podłoża.

2.11. Podłoże z czterotionianem sodowym

Bulion o pH 7,4 ÷ 7,6 (2.2) 900 ml.

Węglan wapniowy 45 g.

Jod w roztworze wodnym jodku potasowego 20 ml.

Tiosiarczan sodowy ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$), roztwór wodny 50-procentowy 100 ml.

Żółć bydlęca 50 ml.

Zieleń brylantowa, roztwór wodny 0,1-procentowy 10 ml.

Przygotowanie składników:

a) węglan wapniowy wyjaławiać, w kolbie pojemności 2 l, w suszarce o temperaturze 160°C przez 60 min,

b) jod w jodku potasowym - 25 g jodku potasowego rozpuścić w 20 ml wody destylowanej i dodać 20 g jodu; po rozpuszczeniu jodu, dopełnić wodą destylowaną do 100 ml,

c) tiosiarczan sodowy - 50 g tiosiarczanu sodowego rozpuścić w 100 ml wody destylowanej i wyjałowić w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min,

d) żółć bydlęcą - przesączyć przez watę i wyjaławiać w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min.

Przygotowanie podłoża: do kolby z węglanem wapniowym dodać w sposób jałowy bulion, roztwór jodu, tiosiarczan sodowy, żółć i zieleń brylantową, dokładnie wymieszać i rozlać do kolb po około 50 ml. Wyjaławiać dwukrotnie w parze bieżącej przez 20 min.

2.12. Podłoże Mac Conkey'a. Podłoże przygotować z Suchego podłoża Mac Conkey'a, produkowanego przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek w Warszawie BIOMED zgodnie ze sposobem podanym na opakowaniu.

W przypadku braku podłoża w stanie suchym należy przygotować je wg następującego przepisu:

woda destylowana 1000 ml,

pepton Proteobak (Bacutil) 20 g,

laktoza 10 g,

chlorek sodowy 5 g,

bezoksycholan sodowy 0,9 g,

agar 17 g,

czerwień obojętna, roztwór 1-procentowy wodny 3 ml,

fiolet krystaliczny, roztwór wodny 0,1-procentowy 1 ml.

Wszystkie składniki, oprócz czerwieni obojętnej, fioletu krystalicznego i laktozy, rozpuścić w wodzie gorącej doprowadzić pH 7,3÷7,4, zagotować, przesączyć przez watę, dodać barwniki i laktozę, wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 20 min. Rozlać na płytki, pH końcowe powinno wynosić 7,1.

2.13. Podłoże SS (Salmonella-Shigella). Podłoże przygotować z Suchego podłoża agarowego SS produkowanego przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek w Warszawie BIOMED zgodnie ze sposobem podanym na opakowaniu.

W przypadku braku podłoża w stanie suchym należy przygotować je wg następującego przepisu:

bulion zwykły (2.2) 1000 ml,

tiosiarczan sodowy ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) 8,5 g,

cytrynian sodowy ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) 8,5 g,

dezoksycholan sodowy 2 g,

agar 20 g,

cytrynian żelazowy ($FeC_6H_5O_7$) 1 g,

laktoza 10 g,

czerwień obojętna, roztwór wodny 1-procentowy 2,6 ml,

zieleń brylantowa, roztwór wodny 0,05-procentowy 0,66 ml.

W gorącym bulionie rozpuścić dezoksycholan sodowy, tiosiarczan sodowy, cytrynian sodowy i agar. Doprowadzić pH do 7,6, zagotować, przesączyć przez watę, dodać cytrynian żelazowy, rozpuszczony w 10 ml wody destylowanej, laktozę i barwniki, zagotować i rozlać na płytki. Nie sterylizować.

2.14. Podłoże Sołtysa. Podłoże przygotować z Suchego podłoża Sołtysa, produkowanego przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek w Warszawie BIOMED zgodnie ze sposobem podanym na opakowaniu.

W przypadku braku podłoża w stanie suchym należy przygotować je wg następującego przepisu:

bulion zwykły (2.2) 700 ml,
agar 20 g,
taurocholan sodowy 3,5 g,
mleko odtłuszczone 300 ml,
fuksyna kwaśna, roztwór wodny 5-procentowy 10 ml,
czerwień obojętna, roztwór wodny 1-procentowy 5 ml,
zieleń brylantowa, roztwór alkoholowy 5-procentowy 14 ml.

Do bulionu dodać agar i taurochlan sodowy, zagotować, ochłodzić do temperatury pokojowej, doprowadzić pH 7,4 ÷ 7,6, rozlać miarowo do butelek i wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min. Do wyjałowionego i rozpuszczonego podłoża agarowego z taurocholanem dodać meleko wyjałowione w 117°C przez 20 min oraz barwniki, dobrze wymieszać i rozlać na płytki. Podłoże powinno mieć barwę ciemnozieloną z odcieniem niebieskim.

2.15. Podłoże Wrzoska

Wyciąg z wątroby 1000 ml.
Pepton Aminobak (Bacutil) 10 g.
Chlorek sodowy 5 g.
Glukoza 5 g.
Kostki wątroby około 0,5 cm^3.

Przygotowanie wyciągu z wątroby: wątrobę pokrajaną w duże kawałki gotować przez pół godziny z wodą destylowaną w stosunku 1 kg wątroby na 2200 ml wody, wyciąg przesączyć przez płótno i wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min; wyciąg z wątroby można zastąpić wyciągiem mięsnym.

Przygotowanie wątroby w kostkach: wątrobę ugotowaną w podany sposób pokrajać w kostkę, zalać 0,85-procentowym roztworem chlorku sodowego i wyjałowić w temperaturze 121°C przez 20 min. Przed sporządzeniem podłoża Wrzoska należy kostki wątroby spłukać na sicie wodą bieżącą.

Przygotowanie właściwego podłoża: rozpuścić pepton i chlorek sodowy, w wyciągu, doprowadzić pH do 8,2, zagotować, sprawdzić pH i przesączyć przez bibułę. Dodać glukozę, rozlać do probówek, do których uprzednio włożono pokrajaną w kostkę wyjałowioną wątrobę (po 2 kostki na probówkę), pokryć płynną jałową parafiną. Wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 30 min lub trzykrotnie w aparacie Kocha, pH końcowe powinno wynosić 7,4 ÷ 7,6.

2.16. Agar cukrowy

Bulion zwykły (2.2) o pH 7,8 1000 ml.
Glukoza 10 g.
Agar 20 g.

Do rozpuszczonego bulionu dodać glukozę, rozpuścić i rozlać do kolb.

Sterylizować w temperaturze 117°C przez 30 min.

2.17. Agar wodny

Woda destylowana 1000 ml.
Agar 20 g.

Agar rozpuścić w wodzie. Wyjaławiać w temperaturze 121°C przez 20 min.

2.18. Podłoże Wilson-Blaira (dla beztlenowców)

Agar cukrowy (2.16) 1000 ml.
Chlorek żelazowy, roztwór 8-procentowy 10 ml.
Wodorotlenek sodowy, roztwór 10-procentowy 6,0 ml.
Siarczyn sodowy, roztwór 20-procentowy 100 ml.

Agar na bulionie z glukozą rozlać do kolb po 100 ml i wyjaławiać w temperaturze 117°C przez 30 min.

Oddzielnie przygotować i wyjałowić w temperaturze 117°C przez 30 min roztwory chlorku żelazowego, wodorotlenku sodowego i siarczanu sodowego.

Przed użyciem agar rozpuścić i ostudzić do temperatury 50°C, dodać przygotowane odczynniki i dokładnie wymieszać, rozlać na płytki.

2.19. Agar na brzeczce

Brzeczka słodowa 5÷10° Blg 1000 ml.
Agar 20 g.

Brzeczkę słodową rozcieńczyć wodą destylowaną do uzyskania 7 ±1° Blg. Doprowadzić pH 6,0÷6,2. Dodać agar i po rozpuszczeniu rozlać do kolb.

Sterylizować w temperaturze 117°C przez 20 min, końcowe pH powinno wynosić 5,6.

ZAŁĄCZNIK 4

BARWIENIE PREPARATÓW METODĄ GRAMA

1. Wykonanie barwienia. Utrwalony w płomieniu preparat pokryć roztworem fioletu krystalicznego (załącznik 3 p. 1.5).

Po 2÷3 min barwnik usunąć, a preparat zalać płynem Lugola (załącznik 3 p. 1.7). Po 1÷2 min płyn Lugola zlać, a preparat przemywać alkoholem etylowym tak długo, aż spływający ze szkiełka alkohol będzie bezbarwny. Następnie spłukać wodą i na preparat nanieść roztwór fuksyny zasadowej (załącznik 3 p. 1.6). Po upływie 15 ÷ 20 s preparat spłukać wodą, wysuszyć bibułą i oglądać pod imersją.

2. Interpretacja wyniku. Bakterie Gram-dodatnie pozostają zabarwione na fioletowo, a bakterie Gram-ujemne odbarwiają się i zostają zabarwione fuksyną na czerwono.

INFORMACJE DODATKOWE

1. Instytucja opracowująca normę - Zakład Badawczy Przemysłu Piekarskiego, Warszawa.

2. Normy związane

PN-64/A-04023 Artykuły żywnościowe. Wykrywanie drobnoustrojów z rodziny Enterobacteriaceae.

PN-72/A-74001 Przetwory zbożowe. Pobieranie próbek

PN-69/A-74250 Wyroby ciastkarskie nietrwałe. Pobieranie próbek

PN-70/A-74104 Pieczywo. Pobieranie próbek

PN-75/A-04024 Produkty żywnościowe. Wykrywanie i ilościowe rozmnażanie gronkowców chorobotwórczych koagulazo-dodatnich

3. Autorzy projektu normy - dr inż. Elżbieta Staszewska, mgr Mieczysława Janik.

BN-84/8070-06	Na str. 8, w Załączniku 4, w p. 2.5, zamiast: Jod 10 g powinno być: Jod 1,0 g oraz zamiast: Jodek potasowy 20 g; powinno być: Jodek potasowy 2,0 g.